



日本学術振興会・産学協力委員会

# R022 量子構造生物学委員会

## 第9回 研究会 資料

2023年3月22日（水）  
13:30～17:00

ミーティングスペースAP日本橋（東京）  
（ハイブリッド形式で開催）

**R022 量子構造生物学委員会**  
**第9回研究会 プログラム**

**2023年3月22日（水）**

会場：ミーティングスペース AP 日本橋  
〒103-0027 東京都中央区日本橋 3-6-2  
日本橋フロント 6F  
(ハイブリッド形式で開催)

13:30 – 13:35

**はじめに**

委員長・三木邦夫（京都大学）

**講 演**

13:35 – 14:35 （講演 1）

司会：副委員長・中川敦史（大阪大学）

**タンパク質溶液の状態制御と産業応用**

筑波大学・数理物質系  
白 木 賢 太 郎

14:35 – 15:00 休 憩

15:00 – 16:00 （講演 2）

司会：運営委員・深海隆明（中外製薬（株））

**生体高分子の中性子結晶構造解析の現状**

量子科学技術研究開発機構（QST）・量子生命科学研究所  
玉 田 太 郎

16:00 – 17:00 （研究交流討論）

**委員・講師間の自由討論**

# タンパク質溶液の状態制御と産業応用

## Control of Protein Solution and Industrial Application

筑波大学 数理物質系

白 木 賢 太 郎

Kentaro Shiraki

Faculty of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

タンパク質は水溶液中できれいに分散させることが難しく、基本的には集合した状態を取りやすい。タンパク質溶液を加熱すると凝集するし、塩やアルコールなどを入れると沈殿が生じ、冷蔵庫に保存しておくだけでも翌日には白く濁っていたりする。最近では、タンパク質の集合状態こそが細胞内にある本来のタンパク質のあり方だという見方が登場し、『相分離生物学』と呼べる新たな分野にまで広がりを見せている。本講演では、タンパク質の凝集や液-液相分離などの溶液状態に関して紹介したい。技術的にはタンパク質の凝集や液-液相分離は、低分子の添加剤によってかなり合理的にハンドリングできるようになってきている。このような技術を使うことで、食品や医薬品などに具体的にどのような応用が加納になってきたのか、また、どのような課題が残っているのかについて、本講演で議論したい。

### タンパク質の凝集と相分離

酵素などの水に溶けやすいタンパク質を 1 mg/mL 程度の濃度で水に溶かすと透明の溶液になる。この溶液に別のタンパク質を添加すると白濁する現象が観察されることが多い。1 種類しかタンパク質が含まれていない場合には静電的な反発の効果があり水によく分散しているが、2 種類目のタンパク質がここに入った場合には静電的な引力も働くからである。このようなデモンストレーションとして、リゾチームとオボアルブミンの組み合わせがある (1)。オボアルブミンの水溶液にリゾチームを添加するとさっと白く濁る様子が観察される。ここ

に塩化ナトリウムを添加すると、塩化物イオンとナトリウムイオンによる静電遮蔽効果によってタンパク質分子間にはたらいていた相互作用が弱められ、その結果タンパク質が分散するようになるのでふたたび透明な状態になる。ここでタンパク質は、白濁して見える程度に大きな集合体を作っているが、イオンによって透明になることから、凝集体のような硬い状態ではなく流動性のある液-液相分離した状態であると推測できる。

リゾチームとオボアルブミンによる白濁した状態をこのまましばらく置いておく。30分後に観察すると、白濁したものが沈んでいる様子があるが、白濁の粒は見た目にはあまり変化がない。ここに同様に塩化ナトリウムを加えても、白濁した状態は溶けないのである。しばらく時間がたつと徐々に疎水性相互作用が強まり、凝集体へといわば成熟するからである。

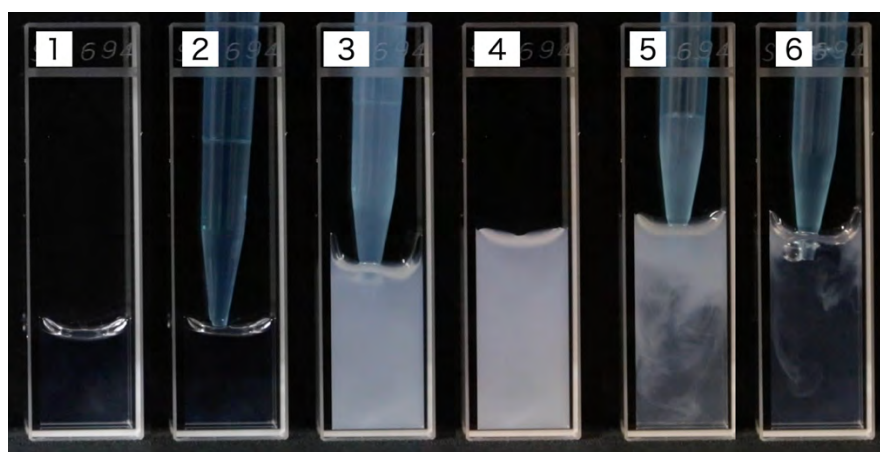


図 1：オボアルブミン溶液にリゾチームを添加したときの状態変化。オボアルブミンが入った溶液（1）にリゾチームを加えると（2）、さっと白濁していく（3）。この白濁した溶液に塩化ナトリウムを加えると（5）、透明になる（6）。

### タンパク質凝集抑制剤

タンパク質の凝集や相分離は低分子で形成を制御することができる。リゾチームとオボアルブミンの例のように、静電相互作用で安定化されているドロプレットはイオン強度を増加させると溶ける。凝集体の場合、カチオン $\pi$ 相互作用はアルギニンで、疎水性相互作用の場合には尿素で弱めることができる。アルギ

ニンやアミノ酸誘導体、アミン化合物などの添加剤や (2, 3)、凝集と相分離への効果の違い (4, 5) など、合理的にハンドリングできるようになってきている。ちなみに、2 種類のタンパク質の凝集は添加剤の効果がより高くなる (6)。それはもともとタンパク質が会合しやすいからである (5)。さらに、卵白のような複雑な成分があるほど凝集抑制剤の効果がさらに高まる。卵白を 100 倍程度に希釈し、よくモデル実験で使われる程度の mg/mL の桁にして加熱しても、卵白をそのまま加熱したときと凝集をはじめる温度はほとんど変化せず、70°C で 1 分程度も加熱すれば凝集がはじまるのが肉眼でもわかる。しかし、0.5 M のアルギニンを追加しておくと 90°C で加熱しても、10 分や 20 分くらいは白濁してこないのである (7)。すなわち、多種類の分子がふくまれる溶液ほど凝集抑制剤の効果が高まることを意味する。それがアルギニンのようなありふれた分子であることは示唆深い。

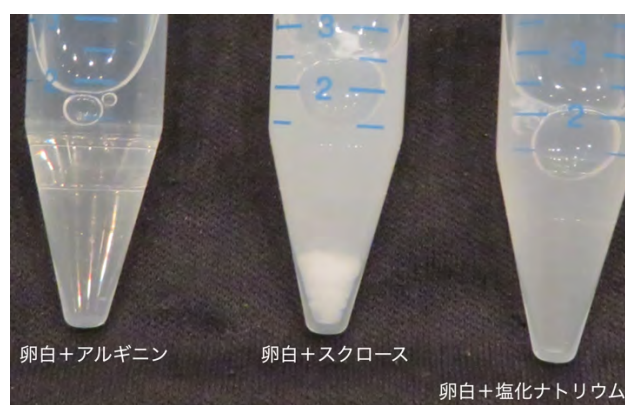


図 2：卵白への凝集抑制剤の効果。アルギニンを添加すると希釈した卵白の溶液は透明だが、スクロースを加えておくと卵白は塊の見える凝集体になる。塩化ナトリウムを追加すると粒の小さな凝集体ができる。

### タンパク質凝集制御の抗体への応用

タンパク質の産業的な課題のひとつに凝集の抑制や促進などの制御技術がある。抗体はとりわけバイオ医薬品への応用が進んでおり、抗体のアミノ酸配列に手をいれることなく、溶媒側をデザインして安定化できるなら価値があるだろう。



高分子をタンパク質溶液に添加することで両者を複合体にし、タンパク質を安定化する方法として開発を進めてきた (8)。このタンパク質・高分子電解質の複合体を protein-polyelectrolyte complex (PPC) という。抗体の溶液にポリリシンを添加すると白濁する。上述のリゾチームとオボアルブミンと同様に静電的な相互作用を主な安定化因子として複合体ができ、一定サイズまで成長するのである。PPC は形成条件によってきわめて可逆性が高く、モノクローナル抗体だけでなく酵素やペプチドなど広く適用できる。PPC は安定化されるだけでなくタンパク質の濃縮法としても使うことができる (9)。

低分子を用いることで高濃度の抗体溶液の粘度をある程度はコントロールできる (10)。また、高濃度の抗体溶液にみられるオパレッセンスのような乳白色化も、アルギニンやアミノ酸誘導体の添加でかなり抑制することができる (11)。添加剤を利用せず安定化するためには、超遠心分離によるガラス状への固形成の技術がある (12)。凍結乾燥と比較して凍結プロセスや脱水プロセスがなく、溶液をガラス状に固めるために新しい保存法になると期待している。

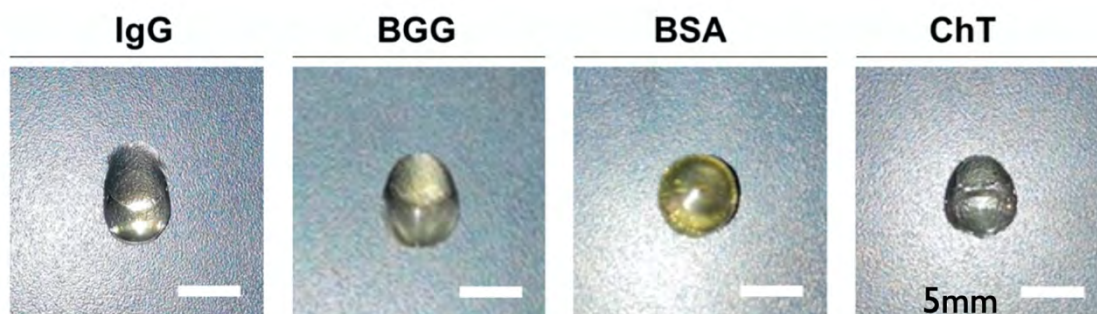


図 3： ガラス状へのタンパク質の固形成。免疫グロブリン G (IgG) やウシガンマグロブリン (BGG)、ウシ血清アルブミン (BSA)、キモトリプシン (ChT) はいずれもガラス状に固めることができる。手で触るとプラスチックのビーズのような感じである。(12)

### タンパク質凝集制御の産業的な応用

タンパク質の研究は、タンパク質分子そのものに注目されることが多かった。しかし、タンパク質は必ず溶媒とともにある。タンパク質溶液系として研究することで、活用しやすい成果になる。タンパク質の凝集制御は、私たちの研究グル

ープでも 10 社以上の産学共同研究での応用例があり、講演でもいくつか紹介したい。例えば、大豆たんぱく質の乳化状態の安定化や、パサつきのある年齢髪にやさしい成分の開発、水に溶けにくい収分子の溶解度の改善などは、凝集抑制剤の直接的な応用である。逆に、バイオ医薬品の精製に使うことができるペプチドタグや、魚肉すり身にふくまれる水溶性の高いタンパク質の回収技術は、タンパク質を凝集させる方法を応用したものである。

- 
1. Iwashita K, Handa A, Shiraki K. Coacervates and coaggregates: Liquid-liquid and liquid-solid phase transitions by native and unfolded protein complexes. *Int J Biol Macromol*. 2018 Dec;120(Pt A):10-18.
  2. Hamada H, Arakawa T, Shiraki K. Effect of additives on protein aggregation. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009 Jun;10(4):400-7.
  3. Shiraki K, Tomita S, Inoue N. Small Amine Molecules: Solvent Design Toward Facile Improvement of Protein Stability Against Aggregation and Inactivation. *Curr Pharm Biotechnol*. 2015;17(2):116-25.
  4. Iwashita K, Mimura M, Shiraki K. Control of Aggregation, Coaggregation, and Liquid Droplet of Proteins Using Small Additives. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018;19(12):946-955.
  5. Shiraki K, Mimura M, Nishinami S, Ura T. Effect of additives on liquid droplets and aggregates of proteins. *Biophys Rev*. 2020 Apr;12(2):587-592.
  6. Oki S, Iwashita K, Kimura M, Kano H, Shiraki K. Mechanism of co-aggregation in a protein mixture with small additives. *Int J Biol Macromol*. 2018 Feb;107(Pt B):1428-1437.
  7. Hong T, Iwashita K, Handa A, Shiraki K. Arginine prevents thermal aggregation of hen egg white proteins. *Food Res Int*. 2017 Jul;97:272-279.
  8. Kurinomaru T, Shiraki K. Aggregative protein-polyelectrolyte complex for high-concentration formulation of protein drugs. *Int J Biol Macromol*. 2017 Jul;100:11-17.
  9. Tsumura K, Hsu W, Mimura M, Horiuchi A, Shiraki K. Lowering the viscosity of a high-concentration antibody solution by protein-polyelectrolyte complex. *J Biosci Bioeng*. 2022 Jan;133(1):17-24.

10. Hong T, Iwashita K, Shiraki K. Viscosity Control of Protein Solution by Small Solutes: A Review. *Curr Protein Pept Sci*. 2018;19(8):746-758.
11. Nakauchi Y, Nishinami S, Murakami Y, Ogura T, Kano H, Shiraki K. Opalescence Arising from Network Assembly in Antibody Solution. *Mol Pharm*. 2022 Apr 4;19(4):1160-1167.
12. Oki S, Nishinami S, Nakauchi Y, Ogura T, Shiraki K. Arginine and its Derivatives Suppress the Opalescence of an Antibody Solution. *J Pharm Sci*. 2022 Apr;111(4):1126-1132.
13. Nakauchi Y, Nishinami S, Shiraki K. Glass-like protein condensate for the long-term storage of proteins. *Int J Biol Macromol*. 2021 Jul 1;182:162-167.



# 生体高分子の中性子結晶構造解析の現状

## Current Status of Neutron Crystallography for Biological Macromolecules

量子科学技術研究開発機構 量子生命科学研究所

玉 田 太 郎

Taro Tamada

Institute for Quantum Life Science,

National Institutes for Quantum Science and Technology (QST)

### 1. 中性子結晶構造解析の特徴

2023 年に入り PDB への構造登録数は 20 万を超えた。X 線結晶構造解析がその 8 割を超える状況は変わらないが、クライオ単粒子解析の技術革新以降の電子顕微鏡の伸びは顕著でついに総数でも NMR を上回った。これら 3 つの手法を合わせると PDB 全体の 99.9%を占める（相関解析も含む）。中性子結晶構造解析は残り 0.1%にあたる 212 構造に相当する（2023 年 1 月末時点）。数だけで言えば他の手法に遠く及ばない。しかしながら、他の手法では得ることが難しい構造情報を取得できる。本発表では中性子結晶構造解析の特徴と現状、さらに今後の展望について紹介したい。

X 線が電子と相互作用するのに対し、中性子は主に原子核と相互作用する。そのため中性子の散乱能（原子散乱長）は原子核の性質に依存し、原子番号とは無関係である。そのため、X 線結晶解析では分解能が極めて高くないと困難な水素原子の観測が、中性子結晶解析ではタンパク質を構成する他の原子と同等に可能である。また、散乱過程で位相が通常と逆転し負の振幅を持つことから（軽）水素は負の散乱長密度を示すため、正の散乱長密度を示す重水素と明瞭に区別して観察できる。さらに、結晶解析で用いる中性子の波長は X 線と同程度（数 Å）であるが、1Å の波長における中性子エネルギーは X 線に比べて 6 桁程度小さい。よって、中性子では室温下でも照射損傷なく回折データを収集できる。この特徴は金属タンパク質の X 線結晶解析でたびたび問題となる照射による金属中心の還元・構造変化の回避にも有用である。

## 2. 中性子結晶構造解析の現状

一方で、中性子結晶解析を実施する上で越えねばならない技術的課題が存在する。先述の中性子結晶解析数の少なさはひとえにその課題の高さに起因する。試料位置での中性子ビーム強度は放射光 X 線に比べて 10 桁以上弱いため、 $1\text{mm}^3$  程度の結晶を作製するのが一般的であり、回折データ収集も通常 1 週間以上要する。大型結晶作製には、結晶化相図作成とシーディング法（および両者の組み合わせ）を用いることが多いが、十分に結晶成長させるには時間を要するため、酸化による結晶成長時の不均一性を防ぐための嫌気環境の利用は良質な大型結晶作製に有効である。さらに、宇宙環境利用（およびそのために蓄積された種々の結晶化技術）や温度応答性ポリマーの利用による大型結晶作製にも、JAXA 山田貢技術領域主幹、尾瀬農之北海道大学教授の研究グループと共同で取り組んでいる。

水素原子の観察に長けたのが中性子の特徴であるが、（軽）水素の非干渉性散乱はほとんどの原子に比べて大きく、それが回折実験の際には高いバックグラウンドとして働いてしまう。よって、試料の重水素化（重水素の非干渉性散乱は軽水素の  $1/40$  程度）は溶媒含量が多いタンパク質結晶からの中性子回折データ収集には必須である。そのため、回折実験前の重水溶液への結晶浸漬や結晶化自体を重水環境下で実施するのが一般的である。この操作でも溶媒はもちろん、タンパク質中の交換可能な水素原子は重水素に置き換わる（交換率は交換時間やタンパク質中の水素原子が置かれた環境に依存する）。しかしながら、炭素原子と共有結合した水素原子はこの操作では（軽）水素のまま置き換わらない。このため、大腸菌発現系や試験管内翻訳系を用いた完全重水素化タンパク質の調製も行われており、完全重水素化タンパク質結晶を用いることで従来の約  $1/10$  のサイズ ( $0.15\text{ mm}^3$ ) で  $2.2\text{\AA}$  分解能の回折データ収集に成功した例 [1]、 $3.2\text{ mm}^3$  の結晶から 14 時間で  $1.8\text{\AA}$  分解能の回折データ収集に成功した例 [2] が報告されている。

中性子源としては、核分裂反応を利用する原子炉（定常炉）と陽子加速器を用いた核破砕中性子源（パルス中性子源）がある。回折データの収集はその特

性に合わせて、定常炉では単色法および準ラウエ法、パルス中性子源においては飛行時間法（TOF 法）が用いられる。単色法は通常の X 線回折データ収集にも用いられているシンプルな手法で積分回折強度の精度が高い反面、一度に測定できるブラッグ反射数に限りがあるため測定に時間を要す（2 週間以上）。一方、準ラウエ法は同時に観察されるブラッグ反射数が増えることで測定効率は良くなるが、ピーク分離やバックグラウンドの上昇という問題がある。パルス中性子を用いた TOF 法は単色法とラウエ法の長所を兼ね備えた方法であるが、実際には時間方向のピーク分離や中性子強度の弱い波長領域由来の積分強度の精度低下の問題もある。構造精密化には中性子だけではなく同一結晶（もしくは同形結晶）から取得した X 線回折データも利用する中性子/X 線同時精密化が広く用いられる。同時精密化により水素/重水素原子の中性子散乱長密度分布（核密度）がより明瞭な観察が可能になった報告 [3]、結晶学的 R 値が数%向上したという報告 [4] もある。

### 3. 中性子結晶構造解析の実例

本発表では、我々が実施した 2 つの例について報告する。1 例目は銅含有亜硝酸還元酵素（CuNIR）の中性子結晶構造解析である [5]。地球の窒素循環において、土壌や水域中の窒素化合物は微生物の働きによって窒素分子へと段階的に変換され、大気中に放出される。この過程は脱窒と呼ばれ様々な酵素がその反応を担っている。亜硝酸還元酵素は亜硝酸イオンを一酸化窒素ガスに変える反応を触媒する。20 世紀以降、工業的な窒素固定法の確立により、人類は化学肥料の使用による農業生産の安定的増加という恩恵を受けた一方で、環境中への過剰な窒素化合物の流入による土壌の富栄養化や水質汚染などの環境問題も引き起こした。よって、脱窒に関わる酵素の 1 つである NIR の機能を理解することは、環境問題解決につながる重要な科学的基盤の構築につながる。

NIR は銅含有型と鉄含有型の 2 つのタイプが存在するが、今回は銅含有型 NIR（CuNIR）を対象として中性子結晶構造解析をおこなった。CuNIR の多くは三量体を形成しており、単量体あたり 2 つの銅イオン（T1Cu、T2Cu）を含

んでいる。T1Cu は生理的電子供与体から電子を受け取る場として存在しており、受け取った電子は分子内を移動し活性中心に位置する T2Cu に伝達され亜硝酸還元反応に消費される。CuNIR の構造研究は本委員会委員の井上豪大阪大学教授の研究グループをはじめ複数の研究グループが主に X 線結晶構造解析を用いて実施しており、多くの知見が蓄積されている。しかしながら、T1Cu から T2Cu への電子移動経路や反応経路中において活性中心に存在する分子種については、今なお議論が続いている。

そこで、我々は反応機構を水素原子の直接観察から検証するため、好熱菌 *Geobacillus thermodenitrificans* 由来 CuNIR の中性子結晶構造解析を実施した。シーディング法により 1 mm<sup>3</sup> を超える大型結晶を作製し、重水溶液に浸漬したのちに、大強度陽子加速器施設 J-PARC の物質・生命科学実験施設 MLF に茨城県が設置した中性子回折装置 iBIX において 100K 下で中性子回折データを収集した。単量体の分子量が 30kDa 以上のタンパク質として世界最高分解能である 1.5 Å 分解能で中性子/X 線同時精密化を完了した。構造解析の結果、T2Cu に配位する化学種が OH<sup>-</sup> イオン（実際には OD<sup>-</sup> イオンとして観察）であることを明らかにできた（図 1A）。今回は酸性条件下で作製した結晶を用いたが、酸性条件下でも OH<sup>-</sup> が安定に存在することがわかり、量子化学計算から予想された反応機構 [6] を支持する結果となった。また、T1Cu から T2Cu への電子

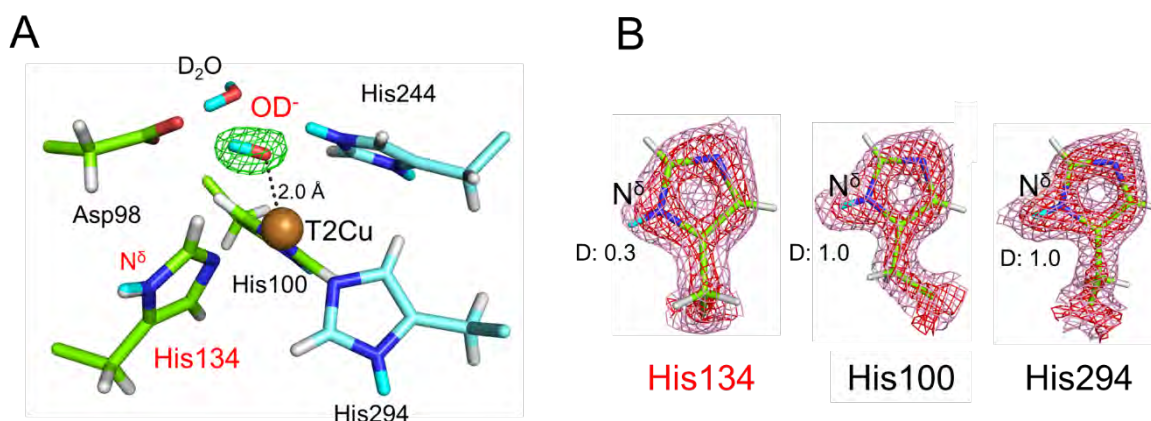


図 1. T2Cu に結合した水酸化物イオン (A) と T2Cu に配位したヒスチジンの重水素化率の違い (B)。緑のメッシュは OD<sup>-</sup>を除いた中性子  $F_0 - F_c$  map (+6  $\sigma$ )、赤及びピンクのメッシュは中性子  $2F_0 - F_c$  map (+3.5, +1.0  $\sigma$ )

移動経路については、量子化学計算から共有結合性（主鎖経由）のみならず非共有結合性（水素結合経由）の 2 つの経路の可能性が示されていた [7]。中性子結晶構造解析の結果から電子移動経路上にあるヒスチジン（His134）側鎖の窒素（N<sup>δ</sup>）原子に結合した水素原子の重水素原子への置換率が、同じく T2Cu に配位している他のヒスチジンに比べて低く（図 1B）、強固な水素結合を形成していることを示唆していた。この強固な水素結合は電子移動に有利に働くと考えられるため、やはり量子化学計算結果を支持する結果であった。

2 例目は高電位鉄硫黄タンパク質（HiPIP）の中性子結晶構造解析である [8]。HiPIP は光合成細菌の光合成電子伝達系においてシトクロム *bc*<sub>1</sub> 複合体から反応中心複合体への電子伝達を担うタンパク質である。本委員会委員長である三木邦夫京都大学名誉教授の研究グループは好熱性光合成細菌 *Thermochromatium tepidum* 由来の HiPIP の構造研究を長年に渡って実施しており、PDB に登録されている構造として世界最高分解能である 0.48 Å 分解能での X 線結晶構造解析から、還元型 HiPIP の鉄硫黄クラスター中の鉄原子の 3d 電子、硫黄原子の 3p 電子に対応する電子密度を明瞭に確認している [9]。また、ペプチド結合の平面構造からのずれも多く観測している。しかしながらアミドプロトンの幾何学的情報はこのような高分解能においても X 線では精緻に知ることは難しい。

そこで、アミドプロトンを高精度に直接観察するため、HiPIP（酸化型）の中性子構造解析を実施した。重水環境下でシーディング法により 1 mm<sup>3</sup> を超える大型結晶を作製し、iBIX において 100K 下で 1.2 Å 分解能の中性子回折データを収集した。同一結晶から取得した X 線回折データ（0.66 Å 分解能）を組み合わせ構造精密化した。電子密度や核密度は個々の原子を独立して観察でき、水素原子の分極まではっきりとわかる密度図（図 2A）を得ることができた。また、水素原子の座標精密化を行うのに十分な反射数があったためアミドプロトンのうち核密度がはっきりと確認でき、占有率が 0.6 を超える重水素原子と 0.75 を超える（軽）水素原子に関して、幾何学的な制約なしで座標の精密化を行った。今回、アミドプロトンの位置を実験的に正確に決定できたため、アミ

ドプロトンを含む平面構造に着目し、N-H-C=O 面における二面角を  $\omega'$  と定義した。カルボニル炭素のピラミッド化角 ( $\theta_C$ ) は  $-5^\circ$  から  $5^\circ$  付近でありほぼ平面性が保たれていたのに対し、アミド窒素のピラミッド化角 ( $\theta_N$ ) は  $-25^\circ$  から  $20^\circ$  と大きく変化し、 $\theta_N$  は  $\omega'$  と強く相関していた (図 2B)。これはアミドプロトンがアクセプターに静電相互作用によって誘引されることでアミド窒素がピラミッド化を起し、 $\omega'$  の平面性が崩れていることを示唆している。このように、これまで画一的に扱われてきたペプチド結合の平面性が、電子状態の影響を受け、平面性からのずれに多様性が見られることを実験的に示すことが出来た。

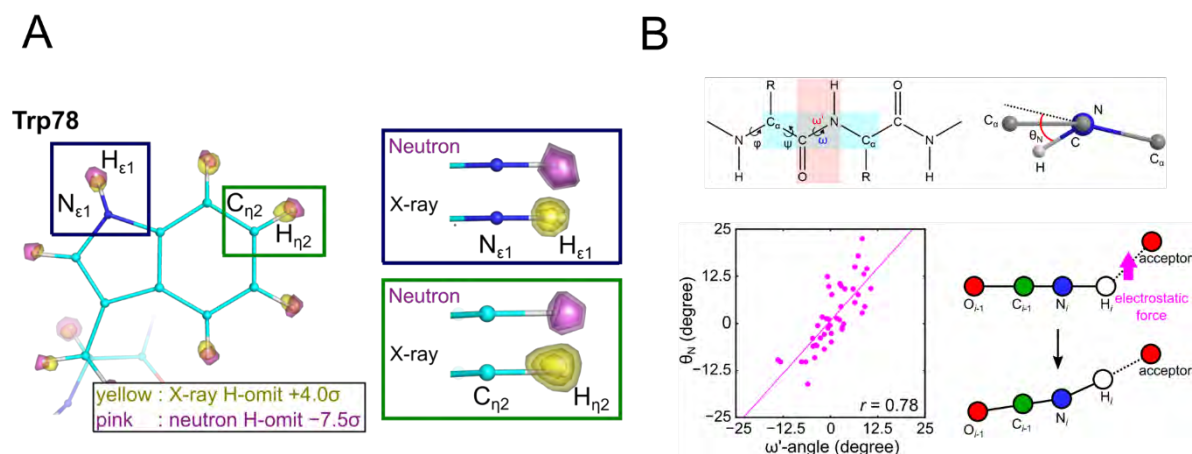


図 2. Trp78 インドール環近傍の水素原子の電子密度を核密度の比較 (A)、ペプチド結合の二面角とピラミッド化角の定義とアミド窒素のピラミッド化によるペプチド平面の歪み (B)

#### 4. 中性子結晶構造解析の今後

冒頭で述べたように数だけでいうと他の構造生物学的手法に遠く及ばない。しかしながら、他の手法では得られない (得られにくい) 情報を中性子結晶構造解析から得ることができるため、いわゆる「相関構造解析」の新たなピースに十分になりうる。中性子結晶構造解析自体は決して新たな手法ではないが、これまではその技術的課題の高さから一般的な構造生物学研究者には敬遠され

ていたのが実情である。そこで、今後中性子をより広く利用いただくために、今年度から AMED/BINDS（構造解析ユニット）に中性子回折（散乱も）が加わり、高度化と支援を担当することとなった。この枠組みで技術的課題の解決とユーザーの裾野を広げていきたいと考えている。

なお、CuNIR の中性子結晶構造解析は大阪大学井上豪教授、福田庸太助教との共同研究、HiPIP の中性子結晶構造解析は京都大学三木邦夫名誉教授、花園祐矢博士研究員（現、東京医科歯科大学助教）との共同研究として実施した。また、iBIX での中性子回折データ収集および処理は茨城大学日下勝弘教授と QST 平野優主幹研究員に協力いただいた。関係者の皆様に御礼申し上げたい。

-----

1. Hazemann, I. *et al.* (2005) *Acta Crystallogr. Sect. D*. **61**, 1413-1417.
2. Munshi, P. *et al.* (2012) *Acta Crystallogr. Sect. D*. **68**, 35-41.
3. Blakeley, M. *et al.* (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 1844-1848.
4. Afonine, P. *et al.* (2010) *Acta Crystallogr. Sect. D*. **66**, 1153-1163.
5. Fukuda, Y. *et al.* (2020) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **117**, 4071-4077.
6. Lintuluoto, M. & Lintuluoto, J. M. (2016) *Biochemistry* **55**, 210-223.
7. Hadt, R. G. *et al.* (2014) *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 15034-15045.
8. Hanazono, Y. *et al.* (2022) *Sci. Adv.* **8**, eabn2276.
9. Hirano, Y. *et al.* (2016) *Nature* **534**, 281-284.



